



Högskolan  
Kristianstad

Högskolan Kristianstad  
291 88 Kristianstad  
044-250 30 00  
[www.hkr.se](http://www.hkr.se)

Självständigt arbete (examensarbete), 15 hp, för Kandidatexamen i biologi med  
inriktning cellbiologi  
HT 2020  
Fakulteten för naturvetenskap

# **Artbestämning av Enterobacteriaceae från vassle med MALDI-TOF MS**

**Hiba Alsaadi**

## Författare

Hiba Alsaadi

## Titel

Artbestämning av Enterobacteriaceae från vassle med MALDI-TOF MS

## Engelsk titel

Identification of Enterobacteriaceae in cheese whey by MALDI-TOF MS

## Handledare

Stina-Mina Ehn Börjesson, Universitetslektor i mikrobiologi

## Examinator

Kjell Johansson, Professor i biomedicin

## Sammanfattning

**Inledning:** Skånemejerier har fått problem med tillväxt av gramnegativa bakterier som tillhörande släktet Enterobacteriaceae i vassle. Den här studien kommer att diskutera arter av Enterobacteriaceae som förekommer i vassle.

**Syfte:** Artbestämma typer av Enterobacteriaceae i vassle vid formning av ostar, och jämföra två ost linjer, rundost och hushållsost.

**Metod.** 3M Petrifilm plattor användes för att utföra Enterobacteriaceae analysen. 8 positiva analysprovtagningar användes. Bakterieanalys odlades ut på BHI följt av artbestämning. För identifiering av bakterier användes metoden Matrix-Assisted Laser Desorption- Time- Of- Flight (MALDI-TOF MS).

**Resultat/Slutsats** Resultatet från studien visade på förekomst av fem olika arter: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter braakii* och *Citrobacter freundii*. Resultatet visade också att det var ingen korrelation mellan pH värde och förekomst av Enterobacteriaceae, att Enterobacteriaceae kommer mest i sena produktioner jämfört med tidigare produktioner samt att antal Enterobacteriaceae var högre i rundost än hushållsosten.

Utifrån studiens resultat dras slutsatsen att förekomst av Enterobacteriaceae kan tyda på dålig hygien och/eller kontaminering, att produktionsomgivning och utrustning samt personalhygien behöver kontrolleras.

## Ämnesord

Gram-negativa bakterier, Enterobacteriaceae, MALDI-TOF MS, ost, vassle

**Author**

Hiba Alsaadi

**Title**

Identification of Enterobacteriaceae in cheese whey by MALDI-TOF MS

**Supervisor**

Stina-Mina Ehn Börjesson, University lecturer in Microbiology

**Examiner**

Kjell Johansson, Professor in Biomedicine

**Abstract**

Skånemejerier has recently had problems with the growth of gram-negative bacteria (belonging to Enterobacteriaceae), in cheese whey. This study will discuss Enterobacteriaceae species found in whey.

**The purpose:** Determine species of Enterobacteriaceae in cheese whey and compare the production of two different types of cheese.

**Method.** 3M Petrifilm plates were used to perform the Enterobacteriaceae analysis. Eight positive assay samples were used. Bacterial analysis was grown on BHI agar plates followed by a species determination. To identify bacteria, the Matrix-Assisted Laser Desorption-Time-Of-Flight (MALDI-TOF MS) method was used.

**Results / Conclusion** The results from this study showed the presence of five different species: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter braakii* and *Citrobacter freundii*. The results also showed that there was no correlation between pH value and the presence of Enterobacteriaceae, that Enterobacteriaceae appeared most in late productions compared to previous productions and that the number of Enterobacteriaceae was more in round cheese than household cheese.

Conclusions based on this study, the presence of Enterobacteriaceae may indicate poor hygiene and / or contamination, that the production environment and equipment as well as staff hygiene need to be checked.

**Keywords**

Cheese, gram-negative bacteria, Enterobacteriaceae, MALDI-TOF MS, whey

## Innehållsförteckning

Introduktion .....	6
Syfte.....	6
Frågeställningar .....	6
Bakgrund .....	7
Ostillverkning.....	7
<i>Mjölkbehandling</i> .....	7
<i>Tillsättning av startkultur (mjölksyrakultur)</i> .....	7
<i>Ystningsprocess och pressning</i> .....	8
Enterobacteriaceae .....	10
<i>Escherichia coli</i> .....	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	11
<i>Raoultella ornithinolytica</i> .....	11
<i>Citrobacter freundii</i> och <i>Citrobacter braakii</i> .....	11
Företagens ansvar .....	11
<i>Kvalitetskontroll av råmjölk</i> .....	12
<i>Rengöring och personlig hygien</i> .....	12
Analysmetoder .....	12
<i>EB Petrifilm för vassleanalys</i> .....	12
<i>MALDI TOF MS</i> .....	13
Beskrivning av ostproduktion på Skånemejerier.....	15
Material och metod .....	16
Antalsbestämning av Enterobacteriaceae och mätning av pH i vassle	16
Pilotstudie och metodutveckling .....	16
Utökad antalsbestämning med Eb-halter >300 CFU/ml .....	18
Statistisk analys.....	18
Resultat.....	18
Pilotstudie.....	18
Förekomst av Eb i Vassle.....	19
Artidentifiering av Enterobacteriaceae.....	21
Skillnad mellan tidiga och sena ystningar.....	22
Korrelation mellan pH och förekomst av Enterobacteriaceae.....	24
Diskussion .....	25

Resultatdiskussion .....	25
Metoddiskussion.....	27
Slutsats .....	28
Tackord.....	28
Referenser .....	29
Övriga Referenser .....	32

## Introduktion

Skånemejeriet i Kristianstad har under senare tid observerat en ökad förekomst och tillväxt av gram-negativa bakterier inom familjen Enterobacteriaceae (Eb) i ystningstankarna vid osttillverkning. Därför vill verksamheten utreda vilka arter av Eb som förekommer för att på så sätt kunna spåra kontamineringskälla.

Osttillverkning har två produktionslinjer, den ena linjen producerar rundost som väger cirka 12 kg per styck. I rundosten ingår till exempel Herrgård och Grevé. Man skiljer mellan ostar genom deras texturer och former, de två sorterna ovan har stora runda hål och kallas för rundpipig. Den andra linjen producerar cylinderost som till exempel hushållsost och gräddost, dessa väger cirka 2,2 kg. Osten tillverkas på samma sätt för de två produktionslinjerna, och följande arbetsmoment ingår i tillverkningen: mottagning av mjölk, förbehandling, ystning och efterbehandling.

## Syfte

Syftet med studien var att artbestämma Eb i vassle vid formning av ostarna med MALDI-TOF MS och jämföra två ost linjer, rundost och hushållsost.

## Frågeställningar

Vilka arter av Eb finns i vassle vid steget för fyllning av ostmassa i ostform och är det några arter som dominerar?

Finns det en skillnad i Eb sammansättning mellan vassle från rundost och hushållsost?

Finns det en skillnad i artsammansättning av Eb från ystningar tidigt i produktionen jämfört med sent i produktionen?

Finns det en korrelation mellan pH och förekomst av Eb i vassle?

## Bakgrund

### **Ostillverkning**

Mjölken för oststillverkning måste ha en god kvalitet det vill säga ha låg bakteriehalt och normal lukt och smak. Den får inte innehålla antibiotika, eftersom det kan störa syrningen under ystningsprocessen (Olofsson, 2010).

### **Mjölkbehandling**

Mjölken lämnar juvret vid ca 37°C vilket är en passande temperatur för bakterietillväxt. Därför måste mjölken kylas så snart den lämnar juvret och på gårdarna finns speciella mjölk tankar för snabb kylning och förvaring innan den transporteras till mejeriet. Kylningstemperatur för mjölken bör ligga på 4°C eller lägre, där mikroorganismers aktivitet är låg. På gården följs god hygienpraxis för att bibehålla god mjölk kvalitet. Det görs till exempel daglig noggrann diskning av mjölkutrustning samt juverhygien. Mjölken genomgår kvalitetskontroll av ackrediterat laboratorium (Bejram, 1996).

Mjölken låg-pastöriseras vid 72°C under 15 sekunder (Livsmedelsverket, 2020a). Pastörisering är en viktig process, där mjölken värmebehandlas tillräckligt så att alla patogena bakterier dör och totalantalet minskas ner för att få en fungerande fermentering (Adams & Moss, 2008). Mjölken kyles till ystningstemperatur som ligger mellan 30–32°C och pumpas in i tankar (Olofsson, 2010).

### **Tillsättning av startkultur (mjölksyrakultur)**

Startkulturerna är mjölksyrabakterier som tillsätts vid oststillverkning för respektive ost typ. Dessa mjölksyrabakterier består av viktiga organismer som används under produktionen av mjölkprodukter. Utöver syrningen ger startkulturen osten specifika karaktär under lagring som bidrar till bland annat smaken och hållbarhet (Gemechu, 2015).

Mjölksyrabakterier är en heterogen grupp av grampositiva bakterier som kan vara stavformiga t. ex *Lactobacillus* eller kocker som *Streptococcus lactis*. De är kända för deras fermenteringsförmåga (Gemechu, 2015). Bakterier producerar bland annat mjölksyra som kan förhindra att oönskade mikroorganismer förökar sig.

Mjölksyrabakterier är indelade i två grupper beroende på deras tillväxtoptimum. Där den ena är mesofila mjölksyrabakterier som har en optimal tillväxttemperatur mellan 20 och 30°C och de andra är termofila, som har sin optimala temperatur mellan 30 och 45°C (Gemechu, 2015).

Det finns olika syrningskulturer som mejeriindustrin använder, de skiljer mellan blandkulturer och renkulturer. Vid osttillverkning används så kallade DL-kulturer, vilka är mesofila blandkulturer och består bland annat av *Lactococcus diacetylactis* och *Leuconostoc cremoris* (Bejram, 1996). Det är de starterkulturer som Skånemejeriet använder för hushållsost. Rundost har lite olika kulturer beroende på vad som ska produceras, men grunden är densamma som för hushållsosten. För att producera rundost brukar  $10^6$ – $10^7$  CFU/ml mjölksyrabakterier tillsättas (Adams & Moss, 2008).

Mjölksyrabakteriekulturer kan kontamineras av bakteriofager eller mikroorganismer som försämrar kulturens syringseffekt. Under osttillverkning kan osten infekteras av bakteriofager som kan påverka surheten, detta kan ge risk till att patogena organismer växer. En viktig källa till bakteriofager kan vara mikroorganismer från startkulturen som bär inom sig lysogena fager (Adams & Moss, 2008). För att undvika att få kulturerna kontaminerade är det viktigt att förvara bakteriekulturen fryst före användning och följa hygienrutiner.

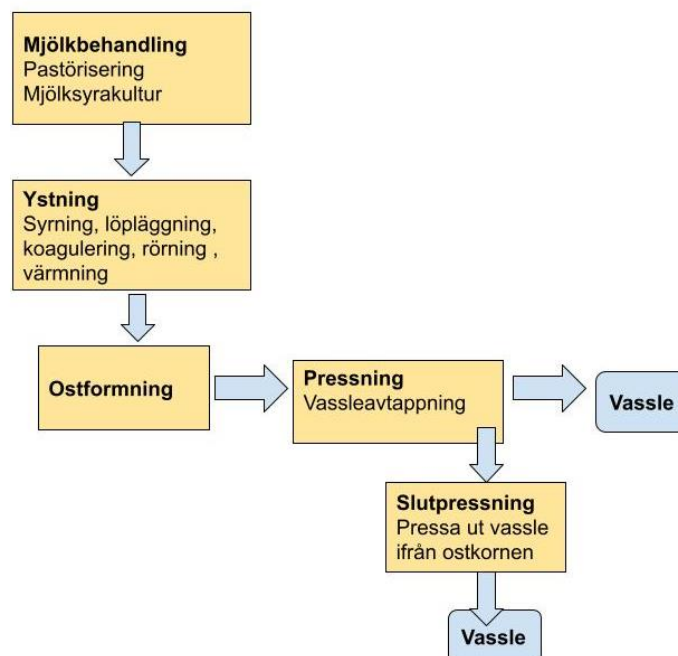
## **Ystningsprocess och pressning**

Ystningsprocessen omfattar syring, löpläggning, koagulering, omrörning och värmning. Vasslen går ur ostmassan under pressning, efter ystningsprocess. Vassle är den vätskedel av mjölken som uppstår vid



tillverkning av ost samt vid ostformning och pressning (figur 1). Den består av vatten, proteiner, laktos samt mineraler. Vasslen kan vara sur med pH <5 eller söt med pH 6 (Chavan et al., 2015).

Vid och efter värmning av ostmassan sker ytterligare omrörning som gör att vasslen avskiljs helt (Bejram, 1996). När ostmassan har fått den rätta fastheten fylls den i pressform för att formas. Pressningstid är mellan 20–30 minuter (förpressning) och därefter skärs osten i önskad storlek. En efterpressning görs för att pressa ut mer vassle. Hur mycket av vasslen som pressas ur ostmassan beror på presstrycket, temperatur och surhetsgraden på ostmassan. Vid högre tryck och högre temperatur släpper ostmassan mer vassle. Självpressning används mest för ostar som har hög vattenhalt, till exempel hushållsost. Ostmassans surhetsgrad påverkar vassleavgången genom att den vattenhållande förmågan minskar i ostmassan ned till pH 4,6. Saltning och lagring sker i efterbehandling där osten får sin slutliga form (Bejram, 1996).



Figur 1. Flödesschema över osttillverkningsmoment fram till slutpressning.

Vid uttag av vassle finns risk att den kontamineras med oönskade mikroorganismer och därför ska man följa åtgärder som till exempel tvätta händerna innan uttag av vassle, använda en ren utrustning och välja vasslen från lyckade ystningar. Den lyckade ystningen ger en vassle med pH 6,1–6,3 efter 3–5 h ystning (Eldrimner, 2018).

## **Enterobacteriaceae**

Enterobacteriaceae (Eb) är en stor familjegrupp av gram-negativa bakterier. Det finns för tillfället 71 släkter beskrivna inom Eb (Parte et al., 2020). De kan finnas i vatten, jord, växter, mat och i tarmkanalen hos djur och människor. Släkten som ingår i Eb är t. ex *Escherichia*, *Citrobacter* och *Klebsiella*. Eb är oxidas-negativa, de kan fermentera och producera syra och bildar gas (Ilbäck, 2018). De flesta arter växer bra vid 37°C. Eb i ett livsmedel kan bero på dålig handhygien, smutsig omgivning, felaktiga rengöringsrutiner, förhöjt pH-värde eller fel temperatur. Det kan även tyda på återkontaminering efter värmebehandling (Livsmedelsverket, 2020b). Flera arter av Eb förknippas med antibiotikaresistens. En speciellt allvarlig resistens som ökar är extended spectrum beta-lactamase (ESBL). Exempel på multiresistenta gramnegativa bakterier som bilda ESBL är *E. coli* och *K. pneumoniae* (Hallgren et al., 2007).

### ***Escherichia coli***

*E. coli* finns normalt i tarmen hos både djur och människor. Bakterien är vanligtvis ofarlig men det finns varianter som är patogena och kan orsaka infektioner. Närvaro i livsmedel av *E. coli* kan tyda på fekal förorening och bristfällig hygien. Bakterien används därför som indikator i livsmedelsindustrin (EG-förordning 2073/2005), dvs den indikerar dålig hygien. *E. coli* är en mesofil tarmbakterie som förökar sig vid 37°C. Den är icke värmeresistent, det vill säga de dör vid låg-mjölkpastörisering nära 72°C under 15 sekunder (Livsmedelsverket, 2020c).

### ***Klebsiella pneumoniae***

*K. pneumoniae* kan hittas på växter, i vatten och magtarmen hos djur och människor. Denna bakterie kan orsaka urinvägsinfektioner, luftvägsinfektioner och bakteriemi (Martin & Bachman, 2018). Förekomst av *K. pneumoniae* har påvisats i färskost enligt en studie av Massa et al., (1992) och i vassle från hårdost (Salazar et al., 2018).

### ***Raoultella ornithinolytica***

*R. ornithinolytica* förekommer naturligt i vatten, jord och insekter (Hajjar et al., 2020). Denna art visat sig orsaka problem inom sjukvården, bland annat genom att vissa stammar blivit resistenta mot antibiotika (Seng et al., 2016). Utöver detta så denna art är förknippad med histaminförgiftning hos människa eftersom den har förmåga att omvandla histidin till histamin.

### ***Citrobacter freundii* och *Citrobacter braakii***

Dessa bakterier tillhör släktet *Citrobacter*. De förekommer normalt i magtarmen hos djur och människor och kan även återfinnas i jord, vatten, och avlopp. *C. freundii* kan orsaka diarré och infektioner hos människor, det finns även vissa som orsakar matförgiftning (Bai et al., 2012). Den kan också orsaka neonatal meningit och är involverad i hjärninflammation (Badger et al., 1999). En annan studie visade att *C. braakii* kan orsaka problem inom sjukvården (Hirai J et al., 2016).

En studie av Pintado et al., (2001) visade att Enterobacteriaceae där inkluderar *Citrobacter freundii* kan hittas i ricotta, en ost typ ursprungligen görs av vassle.

## **Företagens ansvar**

Livsmedelsföretagen ska uppfylla kraven för livsmedels säkerhet. Det är deras ansvar att produkter är säkra, det vill säga att företagen ska uppfylla branschriktlinjen för hygienisk produktion och mikrobiologiska kriterierna (Livsmedelsverket, 2017).

Dessutom ska livsmedelsföretaget följa den rätta metoden för provtagning samt kontrollera faror som kan förekomma i livsmedel. Livsmedel som bedöms vara otillfredsställande får inte säljas eller serveras. Livsmedelsföretaget kan riskera att stoppas eller att deras produkter kan återkallas från marknaden (Livsmedelsverket, 2021).

### ***Kvalitetskontroll av råmjölk***

Mjölkbedomningslaboratorier utför kvalitetskontroll av mjölken och den genomgår en obligatorisk kvalitetsanalys av mejerierna. Där ingår analysen av totalantalbakterier som syftar till mjölkhygien, rengöring av utrustning och kontroll av nedkylning (Bejram, 1996).

### ***Rengöring och personlig hygien***

Rengöring av utrustning och lokaler förhindrar att patogena och övriga bakterier påverkar produktionsprocessen och den färdiga produkten. Rengöring och diskning bör ske efter varje produktionstillfälle eller efter ystning. Vattentemperaturen spelar en viktig roll för rengöringen, och den ska hålla minst 80°C (Sundin, 2012).

Personal kan vara en källa till förekomst och spridning av föroreningar och mikroorganismer till livsmedel. Den personliga hygien gäller allt från arbetskläder till smycken och alla som arbetar inom ett livsmedelsföretag måste följa goda hygienrutiner. Detta gäller även övriga besökare och transportpersonal som kan befinna sig inom en livsmedelslokal (Livsmedelsverket, 2019).

## **Analysmetoder**

### ***EB Petrifilm för vassleanalys***

Eb Petrifilm (3M) är ett odlingsmedium som används för att analysera förekomst av Enterobacteriaceae i livsmedel. Gelen består av Violet Red Bile Glucose (VRBG) och innehåller näringsämnen, ett kallvattenlösligt gelningsmedel, gallsalter som förhindrar tillväxt av grampositiva bakterier och en tetrazolium-indikator som gör räkning av Eb lättare. Eb syns på

Petrifilm 3M-plattor som röda kolonier antingen med gasbubblor eller med gula zoner (3M, 2017).

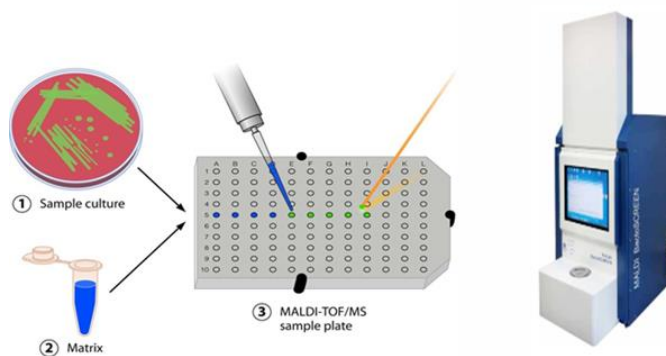
### **MALDI TOF MS**

Matrix Assisted Laser Desorption- Time Of Flight (MALDI-TOF MS) är en masspektrometrimetod som används för en snabb analys av okända organismer till exempel bakterier. En metallplatta hör till MALDI-TOF MS, den består av små ringar där placeras bakterier för analys (se figur 2).

Fördelen med metoden är att den är billig och inte är tidskrävande, jämfört med andra metoder (Sauget et al., 2017). Metoden har använts inom laboratorier för att identifiera olika mikroorganismer, som inkluderar gramnegativa, grampositiva bakterier och till och med svampar (jäst och mögel) (Clark et al., 2013).

Det som analyseras med MALDI-TOF metod är bakteriens ribosomala proteiner. Metoden bygger på att bakterier har olika sammansättning och storlek på proteiner, detta kan liknas vid ett fingeravtryck (Barreiro et al., 2017).

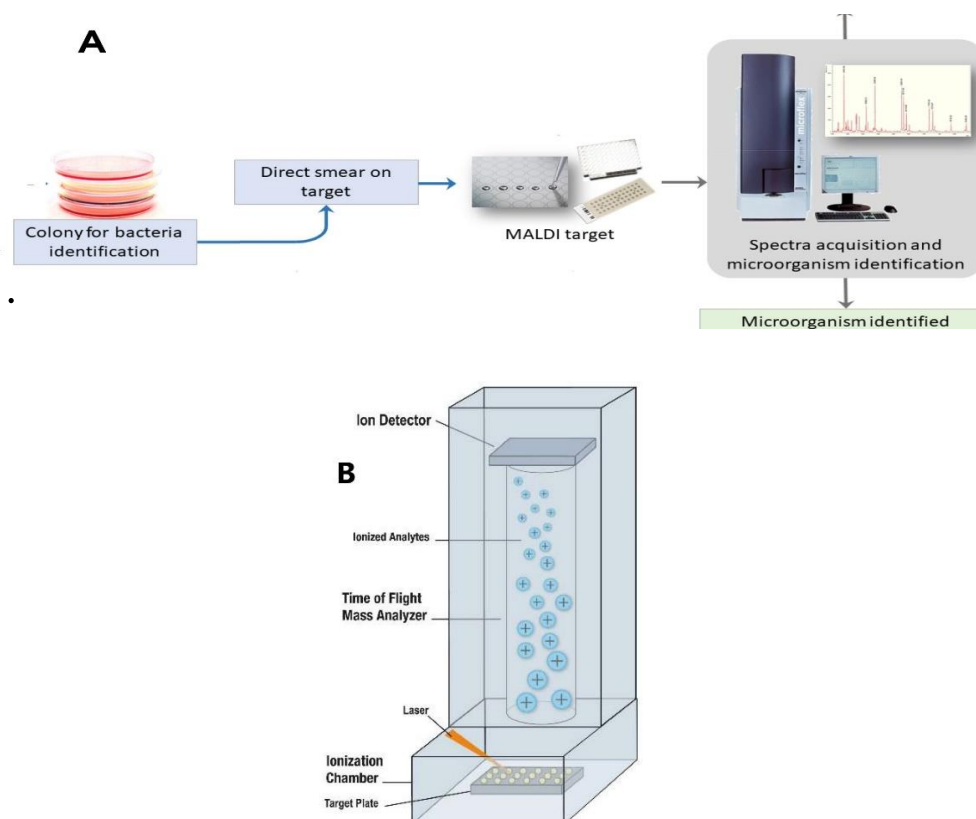
Bakteriens proteiner extraheras med hjälp av myrsyra och joniseras med en matrixlösning, som bryter ned bakteriens cellvägg så att proteiner blir tillgängliga för analys. Detta sker genom att prover bestrålas med UV laser



Figur 2. En schematisk bild för identifiering med MALDI TOF (Clark et al., 2013).

och på det sättet skapas joner från proteinmolekyler. MALDI-TOF har ett databassystem som innehåller information om fragmenten (Hou et al., 2019). Proteinmolekylerna från bakterieisolaten transporteras (TOF) med hjälp av ett elektriskt fält och registreras sedan av en detektor (se figur 3). Informationen från okända prover jämförs sedan med information från kända arter i databassystemet för MALDI-TOF (referensdatabaser).

Sannolikheten att det är samma art/släkt kommer ut i form av scorevärde, där scorevärde visar graden av matchning mot arter i databassystemet (Patel, 2019). Enlig tillverkaren anses ett scorevärde  $>2,00$  vara tillförlitligt och betraktas med stor sannolikhet som korrekt artidentifiering. Scorevärde mellan 1,70–1,99 anger rätt genus. Score-värde som är mellan 0,00–1,69 anger osannolik identifiering.



Figur 3. Visar hur processen går till med MALDI TOF MS metod. A) kolonier plockas från en odlingsplatta och appliceras på Maldi ToF platta för analys. B) proverna bestrålas med UV laser, laddade proteinmolekyler transporteras sedan till detektorn (Patel, 2019).

MALDI-TOF MS analyserar gramnegativa bakterier lättare och säkrare än grampositiva, på grund av uppbyggnaden av deras annorlunda cellväggar (Matsuda et al., 2012). Det är många studier som visar att MALDI TOF MS är en bra metod för att identifiera och detektera bakterier där bland annat, antibiotikaresistenta bakterier som *K. pneumoniae* och *E. coli*.

## **Beskrivning av ostproduktion på Skånemejerier**

Skånemejerier gör sex produktioner hårdost i veckan, en per dag, utom söndagar. Hushållsost tillverkas först varje ny vecka (produktion 1) därefter rundosten, produktion 2–6.

Ostillverkningen börjar med att pastöriserad ystmjolk förs över till ystmjolkstank, där mjölken tempereras till 30°C grader. Det finns fem ystningstankar som var och en kan rymma 13 000 liter mjölk. Under produktionen roterar man runt på dessa fem tankar så att ystmjölken förs över till de olika ystningstankarna så att det blir ett jämnt flöde vid osttillverkningen.

Enligt Lindmark laboratoriechef i Skånemejerier (personlig kommunikation, 11 december 2020), tillsätts mjölksyrabakterierna till ystningstanken före löpen. Hur lång tid innan löpen tillsättes beror på ostsört och hur snabbt starterkulturen sänker pH i ystmjölken. För vissa ostsörter tillsätts den frystorkade starterkulturen direkt i ystningstanken men för andra ostsörter görs först en brukssyra genom att starterkultur sättes till ystmjolk i en särskild tank. Starterkulturen får växa till under en natt och sedan förs lite av denna brukssyra, cirka 1 % av mjölkvolymen till ystningstankarna.

Löpe sätts till ystningstanken då koagulerar ostproteinet och ostkorn av protein och fett bildas. Vasslen avskiljs från ostmassan och samlas upp. Varje produktion omfattar mellan 25–38 ystningar. En ystning innebär alla de ostar som tillverkats från all mjölk som fanns i samma ystningstank, vilket blir drygt 100 ostar. En ystning tar ca 30 min från att man börjar tömma en

ystningstank till att ostmassan är i formarna. Det går ca 10 liter mjölk per 1 kilo ost. Utrustningen och maskiner diskas efter varje produktion.

## Material och metod

I denna studie undersöktes förekomsten av Enterobacteriaceae i vassle under fyra på varandra följande veckor under maj-juni 2020, totalt 12 ostproduktioner.

### **Antalsbestämning av Enterobacteriaceae och mätning av pH i vassle**

Provsättning av vassle och antalsbestämning utfördes vid Skånemejeriers kvalitetslaboratorium. Skånemejerier gör kontinuerligt provtagning av vasslen under ystningsprocessen med avseende totalt antal bakterier, Eb och pH.

Vasslen från fem ystningar poolades fram till och med ystning 25, därefter analyserades varje enskild ystning. Eb Petrifilm (3M™, St. Paul, MN, USA) användes för antalsbestämning av Eb och analysen utfördes enligt följande: 1ml vassle applicerades i mitten på Petrifilmen och spreds på hela tillväxtytan med hjälp av Petrifilmspridare (3M™). Därefter inkuberades Petrifilmen vid 37°C under 24 timmar ( $\pm 2$ ), i staplar som inte översteg 20. Vid analys av Eb i vassle gör Skånemejerier inga spädningar, och därför är den övre gränsen för koncentrationsbestämning  $\geq 300$  kolonibildande enhet per ml (CFU/ml).

pH-mätningar gjordes av Skånemejerier på varje ystning (inte poolad). Mätningar gjordes med kalibrerad pH -mätare i kvalitetslaboratorium.

### **Pilotstudie och metodutveckling**

Under första veckan gjordes en mindre pilotstudie, där vassle från produktion 1 (hushållsosten) och produktion 6 (rundosten) undersöktes med syfte att pröva olika agar för renstrykning av isolat samt för att få en uppfattning om lämpligt antal kolonier för artbestämning från varje ystning.



Två olika typer av substrat prövades, membran Fekal Koliform (mFC, Difco™, Detroit, MI, USA) för isolering av fekala koliforma och Brain Heart Infusion agar (BHI, Oxoid™, Basingstoke, UK). MFC är ett selektivt substrat som hämmar grampositiva bakterier genom tillsats av gallsalter. Indikatorerna rosolsyra & anilinsyra färgar kolonier mörkblå om bakterierna fermenterar Laktos (Zimbro et al., 2009). BHI är ett generellt substrat som används för att odla brett antal mikroorganismer både bakterier och jäst Dessutom prövades om det gick att stämpla odling från Petrifilm till mFC.

I pilotstudien analyserades 30 kolonier från varje produktion. I första hand valdes kolonier från Petrifilmen från de sista ystningarna i produktionen (ca 20 kolonier) och resterande från tidigare ystningar. Vid ett lägre antal än 30 kolonier från en produktion analyserade samtliga kolonier.

## **Artidentifiering av Enterobacteriaceae**

Totalt 12 produktioner undersöktes med avseende på Eb förekomst i vassle, två från hushållsost och tio från rundost. Petrifilmer från produktioner med förekomst av Eb under provtagningsperioden sparades och transporterades från Skånemejerier till Högskolan Kristianstad, där de rörvarades i kyl tills artidentifieringen (max 2 dygn). Identifiering av bakterier utfördes med MALDI-TOF MS Biotyper 3 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Tyskland) enligt tillverkarens manual och den metoden som användes kallas för direkt kolonimetod (Matsuda et al., 2012).

Kolonier plockades med 1 µl vit plastinös (VWR™, Via S. Giusto, Italien) från Petrifilmen och ströks rent på BHI-agar som inkuberades vid 37 °C under 24 timmar. Kolonimaterial från isolaten överfördes till MALDI-TOF provplatta med tandpetare i duplikat och täcktes med 1µl 70 % myrsyra (Bruker Daltonik). Efter 1min torkning i rumstemperatur applicerades 1µl α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrixlösning (HCCA). Isolaten identifieras med MALDI-TOF MS enligt tillverkarens manual (Bruker Daltonik).

Värderingen av MALDI-TOF MS artidentifiering ges med score-värde mellan 0,00–3,00. I denna studie inkluderades arter med scorevärde mellan 1,90–2,30 som ger en sannolik identifiering av arter.

### **Utökad antalsbestämning med Eb-halter >300 CFU/ml**

För att göra en utvidgad antalsbestämning på en-produktion, sparades vid ett tillfälle vasslen från ystningarna med Eb-halter >300 CFU/ml. Vasslen förvarades i plastburkar i kylskåp över en natt hos Skånemejerier innan den transporterades till högskolan för analys.

Antalbestämning gjordes på vassle från produktion 12 (p12) från ystningar 34–38. En serieutspädning utfördes av varje prov, där 1 ml av vassle togs ut för spädning med 9 ml sterilt 0,85% NaCl (Merck, Darmstadt, Tyskland) Spädning ned till  $10^{-3}$  gjordes för varje ystning. 1ml överfördes från varje spädningsrör till Eb Petrifilmer (enligt ovan) och inkuberades vid 37°C under 24 timmar ( $\pm 2$ ).

### **Statistisk analys**

En Pearson-korrelation (ett parametrisk test) gjordes först. Analysen gjordes för att testa om det finns ett signifikant samband mellan pH värde och antal Eb i vasslen vid fyllning av ostformen. Statistisk signifikans definierades som p-värden  $\leq 0,05$ .

## **Resultat**

### **Pilotstudie**

Det substrat som visade sig bäst lämpligt för renstrykning var BHI, eftersom Eb och kontaminerande arter fick olika utseende. Vid renstrykning på mFC agar växte kontaminerande bakterier och det var svårt att särskilja kolonier för identifiering. Stämpling av Petrifilm till mFC fungerade inte eftersom kolonierna flöt samman. Det bestämdes att 30 isolat skulle plockas och identifieras från varje ostproduktion för att få med variationen av arter i produktionerna.

## Förekomst av Eb i Vassle

Av totalt 12 studerade ostproduktioner var 8 positiva för Enterobacteriaceae. Vid tre produktioner (1, 8 och 12) översteg Eb 300 CFU/ml i vassle vid sista ystningen (26–32; 34–38). Inga Eb påvisades i ystningarna för produktion 3, 4, 6 och 11 (se tabell 1).

222 isolat identifierades med MALDI-TOF. Av dessa var 35 *Acinetobacter baumannii* och 9 övriga arter som inte ingår i Eb. Således var det 178 kolonier som tillhörde familjen Enterobacteriaceae. Från rundost (produktion 2 till 6 och 8 till 12) artbestämdes 140 Eb-kolonier och från hushållsost (produktion 1 och 7) 38 kolonier.

I tabell 1 står totala antal Eb kolonier vid varje ystning, hur många som gick att artidentifiera av totalt 30 isolat. Vid vissa produktioner togs de samtliga kolonier som vuxit på plattan. Till exempel vid produktion 9 har vuxit endast 18 kolonier, dvs mindre än det bestämda antalet.

Tabell 1. Förekomst och antal Enterobacteriaceae i vassle från Eb-positiva ystningar och ostproduktioner samt antal artidentifierade isolat. 30 kolonier plockades för analys vid varje Eb-positiv ostproduktion.

Produktion	Antal ystningar	Ystningar där Eb påvisades	Antal Eb (CFU/ml)	Antal artidentifierade isolat av 30
1	28	16-20 21-25 26 27 28	1 10 36 10 >300	15
2	28	21-25 26 27 28	7 8 23 25	25
5	32	27 28 29 30 31 32	20 20 3 2 1 7	18

7	29	26 27 28 29	3 2 5 20	22
8	32	11-15 16-20 21-25 26 27 28 29 30 31 32	2 17 >186 >300 >300 >300 >300 >300 >300 >300 >300	30
9	32	1-5 6-10 11-15 25 26 30 31 32	11 1 1 1 1 1 1 1	10
10	34	21 22 23 24 25 26 27 30 31 32 33 34	2 2 2 2 2 6 6 6 6 19 53 65	30
12	38	11-15 16-20 21-25 34 35 36 37 38	2 9 54 >300 >300 >300 >300 >300	28   13

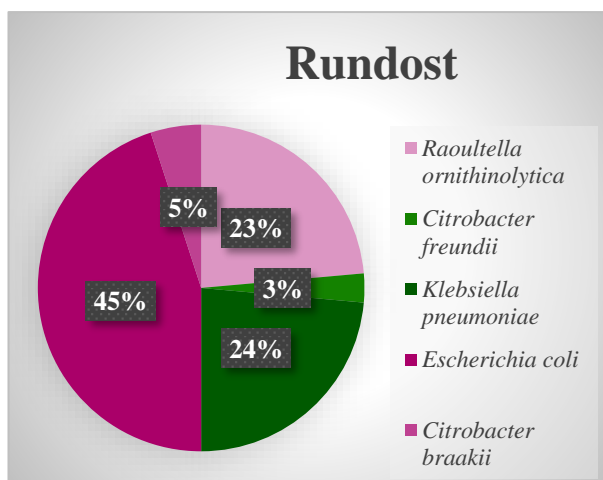
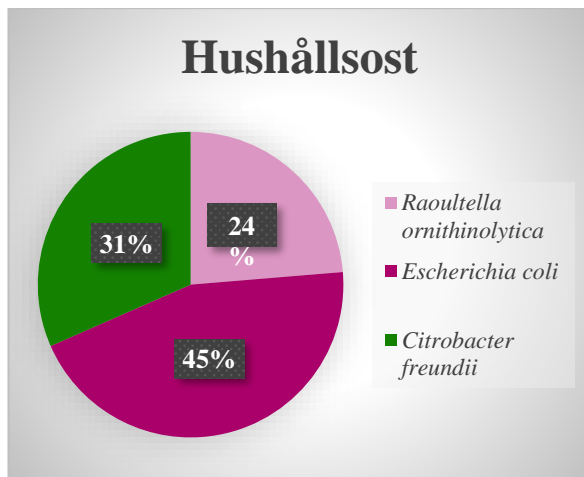
Tabell 2. Utvidgad antalsbestämning av produktion 12, ystning 34 – 38.

Ystningar med >300 CFU/ml.	Antal CFU/ml
34	23 000
35	12 000
36	60 000
37	10 000
38	21 000

Tabell 2 visar alla ystningar med Eb halterna som gav >300 CFU/ml. Samtliga värden ligger kring  $10^3$ CFU/ml. Ystningen som påvisade högsta värdet var ystning 36.

### Artidentifiering av Enterobacteriaceae

I vasslen från rundosten påvisades följande arter: *E. coli*, *R. ornithinolytica*, *C. freundii*, *C. braakii* och *K. pneumoniae*. I vasslen från hushållsosten återfanns endast tre arter, *R. ornithinolytica*, *C. freundii* och *E. coli* (figur 4). Vanligast förekommande var *E. coli* där 63 (45%) av de artidentifierade isolaten var av denna art i rundosten respektive 17 (45%) av totala 38 isolat i hushållsosten. Observerar att isolat från pilotstudien också inkluderats i resultatet. Från rundosten identifierades övriga arter som *R. ornithinolytica* 33 (24%), *K. pneumoniae* 33 (24%), 4 (3%) *C. freundii* och *C. braakii* 7 (5%). Från Hushållsosten identifierades två arter utöver *E. coli*, där förekom *R. ornithinolytica* 9 (24%) och *C. freundii* 12 (32%).



Figur 4. Förekomst och fördelning av arter isolerade från Eb-positiva produktioner av hushållsost (n=2), respektive rundost (n=10). Figuren visar fördelningen av antal identifierade isolat i procent.

## Skillnad mellan tidiga och sena ystningar

Eb förekom mest efter ystning 25, se tabell 3. Det var endast i produktion 9 som Eb förekom redan i de första ystningarna. Från denna produktion identifierades 6 kolonier från ystning 1–5 och en koloni från ystning 26 - 31. Samtliga kolonier identifierades som *E. coli*.

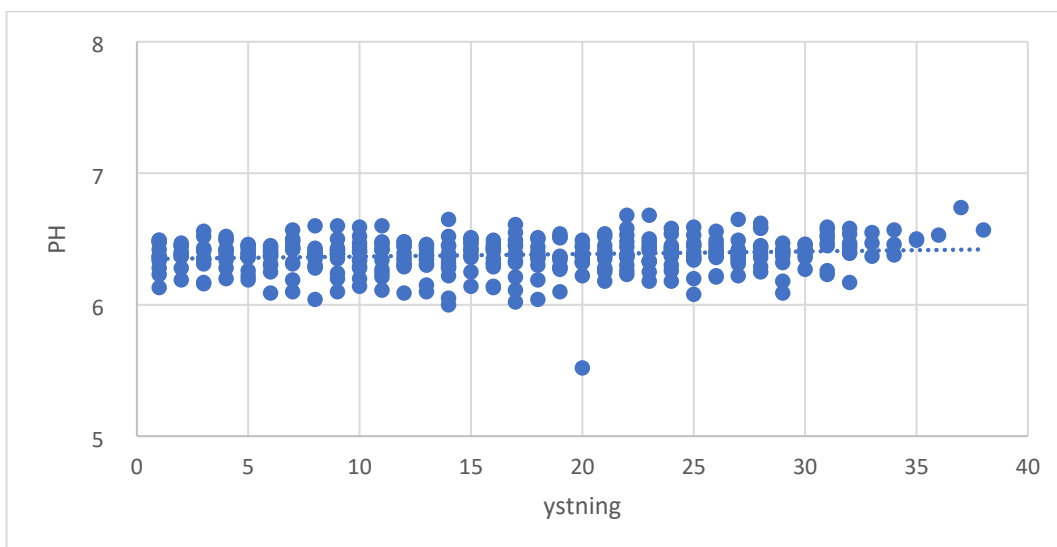
Tabell 3. Fördelning av Eb i ystningar av 8 positiva produktioner, de Eb-negativa produktionerna finns inte med i tabellen.

Produktioner	Ystningar	Antal identifierade isolat (1.99 – 2.30)	Artidentifierade isolat	Övriga arter
1	26–27	6	<i>C. freundii</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Acinetobacter junii</i> <i>Acinetobacter nosocomialis</i>
2	27	4	<i>E. coli</i>	7 <i>A. baumannii</i>
	28	4	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>
5	27–28	11	<i>E. coli</i>	4 <i>A. baumannii</i>
	29	2	<i>E. coli</i>	
7	26	1	<i>R. ornithinolytica</i>	
		2	<i>C. freundii</i>	<i>A. baumannii</i>
	27	2	<i>R. ornithinolytica</i>	
	28	5	<i>R. ornithinolytica</i>	
	29	1	<i>C. freundii</i>	
8	16–20	5	<i>E. coli</i>	
		4	<i>R. ornithinolytica</i>	
		1	<i>C. freundii</i>	
	21–25	10	<i>E. coli</i>	
		7	<i>R. ornithinolytica</i>	4 <i>A. baumannii</i>
		1	<i>C. braakii</i>	2 <i>A. baumannii</i>
		2	<i>C. freundii</i>	
9	1–5	6	<i>E. coli</i>	
	26–31	1	<i>E. coli</i>	
10	33–34	30	<i>K. pneumoniae</i>	
12	21–25	22	<i>R. ornithinolytica</i>	
		6	<i>C. braakii</i>	

	34	5 1	<i>C. braakii</i> <i>R.</i> <i>ornithinolytica</i>	
	36	3 3 1	<i>R.</i> <i>ornithinolytica</i> <i>C. braakii</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>C. freundii</i>	

## Korrelation mellan pH och förekomst av Enterobacteriaceae

Variationen av pH-värdet var liten och ändrades lite från första ystningarna till de sista ystningar oavsett produktion (figur 5).



Figur 5. pH värde på alla ystningar från alla produktionerna (1–12).



Enligt Pearson korrelationsanalys finns det inget signifikant samband mellan förekomst av antal Eb och pH-värde för ystningar och produktioner ( $r=0,001$ ,  $n=366$ ,  $p=0,982$ ). Eb påvisades i höga halter både i p8 och p12 ( $>300$  CFU/ml), därför gjordes korrelationsanalys separat på p8 & p12. Pearson korrelationsanalys visade även ett icke signifikant samband mellan variablerna Eb och pH i produktion 8 och produktion 12 (produktion 8:  $p = 0,57$   $r=0,12$ ,  $N =24$  och produktion 12:  $p =0,28$ ,  $r=0,22$ ,  $N=25$ ).

## Diskussion

### Resultatdiskussion

Eb observerades i åtta av tolv produktioner och det identifierades fem olika arter av totalt 178 Enterobacteriaceae-isolaten. De isolerade arterna var *E. coli*, *R. ornithinolytica*, *C. freundii*, *C. braakii* och *K. pneumoniae*. Pintado et al., (2001) visade att Eb förekommer i vassle från pastöriserade mjölk vilket detta kan styrka den här studien. I denna studie *E. coli*, var den mest förekommande Eb-arten.

*E. coli* ingår som processhygienkriterium för ost gjord på både pastöriserad & opastöriserad mjölk i Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 2073/2005 av den 15 november 2005 om mikrobiologiska kriterier för livsmedel. *E. coli* dör vid pastörisering så förekomst visar på att mjölken blivit återkontaminerat. Enligt Livsmedelsverket (2020b) kan förekomst av Eb bero på hur livsmedlet behandlats vid produktion och kan indikera till exempel dålig personalhygien, bristande rengöring av mejeriutrustning, felaktig kylförvarning eller användning av orent vatten som återkontaminerat efter värmebehandlingen. Allt detta kan orsaka kvalitetsfel och produktförstöring. Vasslen som visar positiv för *E. coli* kasseras och ostar som har varit positiva för Eb sätts i karantän och frisläpps för försäljning först när Eb inte längre kan påvisas enligt Hans Lindmark (personlig kommunikation, 11 maj 2021).

Under ystningsprocessen kan pH runt 6 och temperatur på 32° C utgöra en bra miljö för tillväxt av Eb (Eldrimner, 2018). Detta bekräftades i denna studie då antalet Eb ökade under ystningen i vissa produktioner, till exempel i produktion 8. En till anledning att Eb växte kan bero på att mjölksyrebakterierna inte hade hunnit växa till, hade dålig tillväxt eller att effekten av syrningskultur försämrats under förvaring (Adams & Moss, 2008). Dålig syrning kan även bero på rester av antibiotika i mjölkråvara. Mjölken från behandlande kor med antibiotika får inte användas i mejeriet. Enligt livsmedelverket (2017) ska mjölkråvara kontrolleras med avseende på förekomst av antibiotika, och mjölken ska kasseras om den påvisar spår av antibiotika.

Ett annat problem kan vara att bakteriofager kan infektera mjölksyrakulturen. Höga koncentrationer av bakteriofager har hittats i ostindustrier både från luften och på mejeritrustning (Verreault et al., 2011).

Att använda en aktiv mjölksyrebakteriekultur i stället för en frystorkad minskar risken för att oönskade mikroorganismer ska växa till vid tillverkning, eftersom en frystorkad kultur vid starten genomgår en lagfas medan den aktiva kulturen kan börja tillväxa direkt efter tillsats (Olofsson, 2010). En aktiv startkultur kan vara en bidragande orsak till att det inte påvisades några Eb i produktionerna 3, 4, 6 och 11 och att antalet Eb under produktion 5 och 9 sjönk från höga halter till ett lågt antal i de sista ystningarna. Detta indikerar att startkulturen har börjat fungera och motverkat Eb, till skillnad från produktion 1, 8 & 12 där Eb växte.

Fördelning av arter var olika i osttyperna, där fem arter hittades i rundosten jämfört med hushållsostens tre. Studien visar en indikation på att *C. freundii* var vanligare i hushållsosten, medan *E. coli* påvisades mer i rundosten. Däremot förekom även *E. coli* i hushållsosten i pilotstudien. Detta indikerar att fler produktioner än 12 bör undersökas för att kunna se vilka arter som är vanliga i mejeriet.

En av frågeställningarna var om det fanns korrelation mellan förekomst av Eb och pH. Denna studie kunde inte påvisa något sådant samband. pH låg kring 6 under hela tiden, vilket är normalt eftersom det i söt vassle ligger på denna nivå under ystningsprocessen (Chavan et al., 2015).

## Metoddiskussion

Jämfört med andra odlingsmetoder som till exempel levanderäkning på Violet Red Bile Glucose agar (VRBG), är Petrifilm 3M mer selektiv och praktisk för Eb analys enligt en studie av Silbernagel & Lindberg (2003). Trots att Petrifilm 3M anses mer selektiv så är den inte 100 % selektiv för Eb. I denna studie gav även andra icke Eb-arter positivt utslag till exempel *A. baumannii*. Problemet med *A. baumannii* är att den fermenterar laktos och bildar gas på samma sätt som Enterobacteriaceae (Howard et al., 2012). Ett exempel på produktioner som bedömts positiva för *A. baumannii* och inte Eb vid artbestämningen var produktion 2, 5, och 8. Det kan betyda att Petrifilmer som har mer än 300 CFU/ml kan innefatta andra arter än Eb. Dock av 13 möjliga identifierade arter som analyserades från Petrifilm med 300 CFU/ml hittades inga *A. baumannii*, dessa undersökte kolonier visade samma förekommande arter i andra produktioner nämligen *R. ornithinolytica*, *C. braakii*, *K. pneumoniae* och *C. freundii*. Det vill säga att de positiva produktioner som påvisade förekomst av *A. baumannii* var ett undantag eftersom vid alla produktioner var Eb som förekom ofta.

Ett annat problem i denna studie var att selektiva substrat innebar att det fanns fler bakteriearter i en och samma koloni. Detta blev uppenbart när renstrykning gjordes på BHI av isolaten från Petrifilmen inför MALDI-TOF analys. För att undvika kontaminering av isolaten gjordes upprepade renstrykning på BHI plattor samt för misstänkt orena isolat gjordes identifieringen om fler gånger efter renstrykning.

Anledning att analysera 30 isolat från varje produktion var att många produktioner har ett lägre antal utväxt av kolonier. För att få jämförbart antal från alla produktioner begränsades antalet. Till exempel produktion 7

hade exakt 30 isolat. Däremot produktion 9 hade endast 18 isolat som utväxt på 3M Petrifilm, därför blev det inte alltid 30 isolat att analysera på alla produktioner. Färre än 30 isolat per produktion hade riskerat att missa arter med lägre förekomst.

## Slutsats

Sammantaget ger den här studieinformation att förekomst av Eb varierar mellan olika produktioner och att pH inte kan användas som en indikator för tillväxt av Eb. Förekomst av Eb kan först och främst bero på återkontaminering i processen och detta innebär att hygienrutinerna behöver ses över. Vidare kan det bero på att starterkulturerna är kontaminerade av bakteriofager och/eller att starterkulturerna inte snabbt kommer i gång vilket ger dålig effekt av syrningskulturen.

Förekomst av Eb kan orsaka hälsoproblem, det därför Skånemejerierna inte använder vasslen som innehåller Eb och lagrar ostarna tills halterna är nere under detektionsgräns.

## Tackord

Stort tack till min handledare Stina Mina Ehn Börjesson och till Hans Lindmark lab. chefen i Kristianstad som har hjälpt mig med detta arbete. Särskilt tack till Gunnar Gunnarsson och till Christer Halldén som gett feedback i mitt arbete.

## Referenser

Adams, M. & Moss, M. (2008). Food Microbiology, 3rd Edition.

Badger, J. L., Stins, M. F. & Kim, K. S. (1999). *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. Infection and Immunity. 67(8), 4208–4215. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.4208-4215.1999>.

Bai, L., Xia, S., Lan, R., Liu, L., Ye, C., Wang, Y., et al. (2012). Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. PLoS ONE. 7, e33054. DOI: 10.1371/journal.pone.0033054.

Barreiro, J. R., Gonçalves, J. L., Campos Braga, P. A., Dibbern, A. G., Eberlin, M. N. & Veiga dos Santos, M. (2017). Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of Dairy Science. 100 (4), 2928–2934. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11741>

Bejram, B. (red). (1996). Mejeriboken-från gräs till konsument. Livsmedelsbranschens utbildningsorgan. Mejerierna service AB. ISBN 91-630-4232.

Chavan, R. S., Tanmay, N., Anil, K. & Shraddha, B. (2015). Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications, Journal of Food. Processing & Technology. 6,10, ISSN: 2157-7110. DOI: 10.4172/2157-7110.1000495.

Clark, A. E., Kaleta, E.J ., Arora, A. & Wolk, D. M. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 26 (3), 547-603. DOI: 10.1128/CMR.00072-12.

Gemechu, T. (2015). Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African Journal of Food Science*. 9 (4), 170–175. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1276>

Hajjar, R., Ambaraghassi, G., Sebahang, H., Schwenter, F. & Su, S. H. (2020). *Raoultella ornithinolytica*: emergence and resistance. *Infection and Drug Resistance*. 13, 1091–1104. DOI: 10.2147/IDR.S191387.

Hallgren, H., Gustafsson, I. & Ripa, T. (2007) ESBL-increasing resistance problems. Cephalosporins are no longer the obvious choice in diffuse infections. *Läkartidningen*. 104: 3883–3885.

Hirai J., Uechi K., Hagihara M., Sakanashi D., Kinjo T., Haranaga S., et al. (2016). Bacteremia Due to *Citrobacter Braakii*: A Case Report and Literature Review. *Journal of Infection & Chemotherapy*. 22 (12), 819–821. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.07.003.

Hou, T.-Y., Chiang- Ni, C. & Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*. 27 (2), 404 -414. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>

Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A. & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*. 3(3), 243–250. DOI: [10.4161/viru.19700](https://doi.org/10.4161/viru.19700).

Martin, R. M. & Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8 (4). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>

Massa, S., Gardini, F., Sinigaglia, M. & Guerzoni, M. E. (1992). *Klebsiella pneumoniae* as a Spoilage Organism in Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 75 (6), 1411–1414. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77894-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77894-1).

Matsuda, N., Matsuda, M., Notake, S., Yokokawa, H., Kawamura, Y., Hiramatsu, K. & Kikuchi, K. (2012). Evaluation of a Simple Protein

Extraction Method for Species Identification of Clinically Relevant Staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (12) DOI: 10.1128/JCM.01512-12.

Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 5607-5612. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332.

Patel, R. (2019). A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *Journal of Fungi*. 5 (1), 4. <https://doi.org/10.3390/jof5010004>

Pintado M. E, Macedo A. C. & Malcata F. X. (2001) Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science & Technology*. 7, 105–116.

Salazar, J. K., Carstens, C. K., Ramachandran, P., Shazer, A. G., Narula, S. S., Reed, E., & Schill, K. M. (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiology*. 18 (1), 1-13.

Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X. & Hocquet, D. (2017). Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends in Microbiology*. 25 (6), 447–455. DOI: 10.1016/j.tim.2016.12.006.

Seng, P., Boushab, B. M., Romain, F., Gouriet, F., Bruder, N., Martin, C., et al. (2016). Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. *The International Journal of Infectious Diseases*. 45, 65–71. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.02.014.

Silbernagel, K. M. & Lindberg, K. G. (2003). 3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate Method for Enumeration of

Enterobacteriaceae in Selected Foods: Collaborative Study. Journal of AOAC International. 86 (4), 802-814. DOI: 10.1093/jaoac/86.4.802.

Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G. M., Veillette, M., Masse, D., Lindsley, W. G., Moineau, S. & Duchaine, C. (2011). Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. Applied and Environmental Microbiology. 77 (2), 491–7. DOI:10.1128/AEM.01391-10.

Zimbro, M. J & David, A. P. (2009). Difco™ & BBL™ Manual-of Microbiological Culture Media. Sparks. MD: Becton-Dickinson and Co., pp 334.

## Övriga Referenser

Eldrimner (2018). Branschriktlinjer hantverksmässig tillverkning av mejeriprodukter. ISBN 978-91-639-3953-2. Tillgänglig:

<https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/foretag-regler-kontroll/branschriktlinjer/ost---guide-till-god-hygiensk-praxis-vid-hantverkssmassig-tillverkning-av-ost-och-andra-mjolkprodukter-191218.pdf>  
(2022-05-27)

Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 2073/2005 av den 15 november 2005 om mikrobiologiska kriterier för livsmedel. (EUT L 338, 22.12.2005): <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SV/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20200308&qid=1603110119062&from=SV>

Ilbäck, J. (2018). Mikrobiologi, Livsmedel, Enterobacteriaceae. <https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/publikationsdatabas/rapporter/2018/kompetensprovning-av-laboratorier-mikrobiologi-rapport-livsmedel-april-2018.pdf>

Livsmedelsverket (2017). Branschriktlinjer för hygienisk produktion av mjölkprodukter. Tillgängligt på:



<https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/produktion-handel-kontroll/branschriktlinjer/branschriktlinje-for-hygienisk-produktion-av-mjolkprodukter.pdf>

Livsmedelsverket. (2019). Personlig hygien

<https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/345/personlig-hygien>

Livsmedelsverket. (2020a). Pastöriserad mjölk

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/mat-och-dryck/mjolk-och-mejeriprodukter/pastoriserad-mjolk#:~:text=L%C3%A5gpast%C3%B6risering%20%C3%A4r%20det%20som%20normalt,f%C3%B6r%20att%20uppn%C3%A5%20%C3%B6nskad%20avd%C3%B6dning>

Livsmedelsverket.(2020b). Enterobacteriaceae

<https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/152/enterobacteriaceae>

Livsmedelsverket. (2020c). Escherichia coli.

Hämtad 2020-8-14 från:

<https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/154/escherichia-coli>

Livsmedelsverket.(2021).Mikrobiologiska kriterier

Hämtad 13.10.2020 från:

<https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/121/mikrobiologiska-kriterier>

Olofsson, I. (2010).Handledning för kontroll av hantverksmässig tillverkning av ost. ISBN 978-92-893-2039-9 Tillgänglig (2022-05-24)

<https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:700698/FULLTEXT01.pdf>

Sundin, B. (2012). Hemligheten bakom mjuka ostar.

[https://www.eldrimner.com/core/files/ystning\\_mjuka\\_ostar.pdf](https://www.eldrimner.com/core/files/ystning_mjuka_ostar.pdf)

3M Petrifilm™. (2017). Enterobacteriaceae Count Plate Product Information Sheet: Product-instructions-3m-petrifilm-enterobacteriaceae-count-plate :6420/6421

<https://multimedia.3m.com/mws/media/695831O/product-instructions-3m-petrifilm-enterobacteriaceae-count-plate.pdf>